

2. Material und Methoden:

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

2.1.1.1 Chemikalien

| | |
|--|-----------------------------|
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| Agar | Difco, USA |
| Agarose | Bethesda Research Lab., USA |
| Ampicillin | Sigma, USA |
| Bidestilliertes Wasser | Fluka, Schweiz |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| BSA (Bovines Serumalbumin) | Sigma, USA |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Merck, Darmstadt |
| dNTPs (Deoxynukleotidtriphosphate) | Applied Biosystems, USA |
| EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure) | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Biomol, Hamburg |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Fikoll | Amersham, Schweden |
| FKS (Foetales Kälberserum) | Life Technologies, USA |
| Evans Blue | Arbeitsgruppe P12, RKI |
| Hoechst Solution 33258 (Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoff) | PolySciences Inc., USA |
| IPTG (Isopropyl- β -Thiogalaktosylpyranidose) | Biomol, Hamburg |
| LE-Agarose | Roche Diagnostics, Mannheim |

| | |
|---|----------------------------|
| L-Glutamin | Gibco, UK |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- Ethansulfonsäure) | Gibco, UK |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| L-Lysin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Applied Biosystems, USA |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat (NaAc) | Merck, Darmstadt |
| NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren) | Gibco, UK |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| 10 x PCR Puffer | Applied Biosystems, USA |
| Rotihistol | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| Tris (Trishydroxymethylendiamin) | Sigma, USA |
| Triton-X-100 | Merck, Darmstadt |
| Tween 20 | Merck, Darmstadt |
| X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Galaktosid) | Biomol, Hamburg |

2.1.1.2 Enzyme

| | |
|--------------------------------|------------------------------|
| Alkalische Phosphatase | NE Biolabs, Schwalbach |
| Restriktionsenzyme | NE Biolabs, Schwalbach |
| T4-DNA-Ligase | NE Biolabs, Schwalbach |
| <i>Taq</i> Gold DNA Polymerase | Perkin Elmer, Weiterstadt |
| TAKARA LA <i>Taq</i> | Takara, Shuzo Co Ltd., Japan |

2.1.2 Medien

2.1.2.1 Medien für die Zellkultur

| | |
|------------------------|--|
| D-MEM/Zellkulturmedium | DMEM-Pulver für 10 l 37 g NaHCO ₃ 0,2 g Penicillin G 0,2 g Streptomycinsulfat ad 10 l bidestilliertes Wasser pH 7,2 mit HCl einstellen |
|------------------------|--|

| | |
|-----|----------------------------------|
| MEM | Life Technologies, Paisley/UK |
|-----|----------------------------------|

| | |
|------------|----------------------------------|
| RPMI, 1640 | Life Technologies, Paisley/UK |
|------------|----------------------------------|

Für die Zellkultur wurden die Medien frisch komplettiert mit:

DMEM, RPMI:
10 % FKS
2 mM Glutamin
2 % nicht essenzielle
Aminosäuren
50 Einheiten/ml Penicillin-
Streptomycin

| | |
|------|------------------------|
| bzw. | DMEM, MEM: 10 % FKS |
|------|------------------------|

2.1.2.2 Bakterienmedien

| | |
|------------------|--|
| SOB | 20 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Yeast Extract 0,58 g/l NaCl 0,19 g/l KCl pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren anschließend hinzufügen: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ |
| SOC | 20 mM Glucose in SOB |
| TY-Flüssigmedium | 10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Yeast Extrakt 5 g/l NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen |
| LB-Flüssigmedium | 10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Yeast Extrakt 10 g/l NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen |

Bei Bedarf wurde den Medien nach Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährböden erfolgte die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die nachstehend aufgeführten Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Alle Prozentangaben sind, falls nicht anders erwähnt, Volumenprozent.

Enzymreaktionen wurden in dem vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Puffersystem inkubiert.

| | |
|----------------------|---|
| DNA-Load-Mix | 70 Teile 70 % Sucrose 5 Teile Bromphenolblaulösung gesättigt in H ₂ O |
| Eosinlösung | 0,1 % Eosin 0,2 % Natriumazid in PBS |
| Ethidiumbromidlösung | 10 g/l |
| PBS-Puffer | 140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄ |
| 10 x TBE-Puffer | 1 M Tris 0,9 M Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,4 ± 0,1 |
| TE-Puffer | 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 0,1 mM EDTA |

| | |
|-----------------|---|
| 10 x TNE-Puffer | 100 mM Tris 10 mM EDTA 2 M NaCl, pH 7,4 mit HCl einstellen |
| Trypsinlg. | 0,25 % (v/v) Trypsin 3 mM EDTA in PBS |

2.1.4 Bakterienstämme

| | |
|--|----------------|
| E.coli DH5 α (F'/endA1 hsdR17(rk-,mk+) suPE44 thi-1 recAI gyrA, (Nalr)relA1 D(lacZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80lacZ Δ M15)) | Hannahan, 1993 |
|--|----------------|

2.1.5 Oligonukleotide

Tab. 2.1: Primer für die Konsensusprimer-PCR

| Primer | Sequenz (5' \rightarrow 3') | Motiv |
|--------|---------------------------------|-----------|
| 143 | AGGTGGGTGTTACACCTYAAYAAAYCCT | RWVFTLNNP |
| 144 | CTACAGTCAACGGATAHCGRTCACASAG | CDRYPLTV |
| 145 | AATGAGAAGTAYTGCAGTAAAGARGG | NEKYCSKE |
| 146 | AGGTAACCAGCCATAAAAARTCRTC | DDFYGWLP |
| 174 | GTGTTTCACBCTYAAYAAAYCCTWCMGA | CFTLNNPX |
| 175 | ATCTTCCCCRTSRTAWCCATCCCACCA | WWDGYXGED |
| 176 | GGATAATGARRARTAYTGCAGTAAAGA | DNEXYCSK |
| 177 | TCKACTCTTSCCACAMCCVGGYGGSCC | GPPGCGKSR |
| 231 | GGTCTCSGGGGBCTKATTGCTSGTRAT | ITSNXXPET |
| 232 | ACCAAACACGWGTRAWYCTCCGRWASAG | LXRRXTRVW |

| | | |
|------------|-----------------------------------|--------------|
| 283 | AATGAGAAGTAYTGCWSTAAAGARGG | YCSKE |
| 284 | CAGAAAGGCAGCCASCCRTARAARTCRTC | DDFYGW |
| 537 | GTGTTTCACBICTYIAAYIAAYICCTWICMIGA | Inos. subst. |
| 538 | ATCTTCCCCRITSIRITAWICCATCCCACCA | Inos. subst. |
| 539 | GGATAATGARIRIARITAYITGCAGTAAAGA | Inos. subst. |
| 540 | TCKACTCTTSICACAMICCVIGGYIGGSICC | Inos. subst. |

Für die standardmäßige Untersuchung der humanen Proben wurden die Primerpaare 174/175 und 176/177 bzw. die später entwickelten Primerpaare 537/538 und 539/540, die über eine höhere Sensitivität verfügen, eingesetzt.

Tab. 2.2: Verwendete Sequenzierungsprimer zur Amplifikation des Taubencircovirus PiCV (*Pigeon circovirus*)

| Primer | Sequenz (5' → 3') | 5'-Position | 3'-Position |
|---------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| 233 | TGGGCATTCCTGCGAAGGGAAACCG | 237 | 261 |
| 234 | AGGAATGCCCAGGGTAAGTAGCACA | 247 | 223 |
| 247 | TTGGTCGCCTGTGTCAATGTG | 1821 | 1841 |
| 250 | TGGGGGGCTAATAGTTGATGG | 1001 | 981 |
| 249 | CATCAACTATTAGCCCCCACC | 982 | 1003 |
| 248 | GCCCGTATTTACTACTTCCGCC | 1882 | 1861 |
| 275 | AAGGGGCCTTTGTGGAGTTCACGT | 804 | 827 |
| 276 | TAATCACTATGGGCTCGCATTTCAGT | 1394 | 1370 |
| 277 | CGTGATGTCAACCCTAGTGGTCTC | 1670 | 1694 |
| 278 | CTTGGGGGGTGTGCTGCCTGGTTT | 76 | 53 |

Tab. 2.3: Verwendete Primer für die diagnostische PCR zum gezielten Nachweis von PiCV (*Pigeon circovirus*)

| Primer | Sequenz (5' → 3') | 5'-Position | 3'-Position |
|------------|-----------------------|-------------|-------------|
| 330 | TGAGGGTGGTCCAAGCAA | 1282 | 1299 |
| 331 | ACAGGAGGAGTAGCTATT | 1893 | 1874 |
| 332 | ATGCGAGCCCATAGTGAT | 1375 | 1392 |
| 333 | TTAGTGAAGGTGGAAAGAGAC | 1711 | 1690 |

Tab. 2.4: Verwendete Primer für die spezifische PCR zur Unterscheidung von PCV1 und PCV2

| Primer | Sequenz (5' → 3') | 5'-Position | 3'-Position |
|------------|--------------------------|-------------|-------------|
| 197 | TGTTACCCCTTAATAATCCTCCG | 862 | 885 |
| 198 | GCTGCATCTTCCCGCTCACTTTCA | 1293 | 1270 |
| 199 | CCACATCGAGAAAGCGAAAGGAAC | 1064 | 1087 |
| 200 | CTCTGCAACGGTCACCAGACTCCC | 1232 | 1209 |

Tab. 2.5: Verwendete Primer zur Durchführung der Kontroll-PCR

| Primer | Sequenz (5' → 3') | 5'-Position | 3'-Position |
|--------------|----------------------------|-------------|-------------|
| F 258 | CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA | detektiert | <i>cytB</i> |
| B 258 | GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA | detektiert | <i>cytB</i> |

Alle verwendeten Primer wurden bei der Firma Metabion GmbH, Martinsried angefordert.

2.1.6 Plasmide

| Plasmid | Funktion | Referenz |
|-------------------------------|---|---|
| pIC1 | Infektiöser Klon von PCV1 zur Herstellung religiierter Virus-DNA | das Genom von PCV1 wurde mit einer Überlappung von 77 bp über die Positionen 1182-1:1759-1105 in den Vektor pUC18 kloniert |
| pPCV2 | Infektiöser Klon von PCV2 zur Herstellung religiierter Virus-DNA | freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. Dominique Mahe, Ploufragan, France |
| pORF4A | Expression des Rep-Proteins von PCV1 in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | (Mankertz and Hillenbrand, 2001) |
| pAM4 | Expression des gespleißten <i>rep</i> -Transkriptes von PCV1 unter Kontrolle des SV40-Promotors | (Mankertz and Hillenbrand, 2001) |
| pAM9 | Expression des volllängen <i>rep</i> -Transkriptes von PCV1 in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | (Mankertz and Hillenbrand, 2001) |
| pSVL-<i>rep</i>(PCV2) | Expression des Rep-Proteins von PCV2 in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | <i>rep</i> Fragment von PCV2 (GER3); PCV2 pos. 813-1768:1-14, Amplifikat <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> HI geschnitten und in pSVL <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI gesetzt |
| pSVL-<i>rep'</i>(PCV2) | Expression des Rep'-Proteins von PCV2 in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | PCR Fragment ausgehend von cDNA mit den Primern F500 und B466 erzeugt, über <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> HI in pSVL-SV40 gesetzt |

| | | |
|------------------------|--|--|
| pSVLrep*(PCV2) | Expression des ungespleißten Rep-Proteins von Rep PCV2 unter Kontrolle des SV40-Promotors | wie pSVL-rep(PCV2) Austausch gegen ein <i>Sac</i> II Fragment, indem alle Spleißstellen mutagenisiert sind. Fragment aus den Primern F505 bis B510 aufgebaut, in pSVL-rep(PCV2)/ <i>Sac</i> II gesetzt |
| pSVL-rep1-103 | zur Expression des N-Terminus von Rep (PCV2) in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | PCV2 Fragment pos. 813-1149 aus pSVL-rep (PCV2) geschnitten mit <i>Xho</i> I/ <i>Sac</i> I; in pSVL SV40 geschnitten <i>Xho</i> I/ <i>Sac</i> I, CIP-behandelt, kloniert |
| pSVL-rep110-314 | zur Expression des C-Terminus von Rep (PCV2) in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | pSVL-rep(PCV2) PCR mit Primer F594/B596; geschnitten <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I gesetzt in Vektor pSVL-SV40 geschnitten <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I |
| pSVL-rep123-178 | zur Expression des C-Terminus von Rep'(PCV2) in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des SV40-Promotors | pSVL-rep(PCV2) PCR mit Primer F595/B596 geschnitten <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I, kloniert in Vektor pSVLSV40 geschnitten <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I |
| pTIK | enthält die vollständige Genomsequenz des Taubencircovirus PiCV | (Soike et al., 2001) |

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

| Bezeichnung | Eigenschaften | Referenz |
|---------------|---|---|
| α-PCV1 | Polyklonaler Kaninchen IgG, gegen PCV1 gesamt | (Tischer et al., 1986) |
| α-PCV2 | Polyklonaler Schweine IgG, gegen PCV2 gesamt | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dominique Mahe, Ploufragan, Frankreich |

| | | |
|------------------|---|------------------------------------|
| Clone M30 | Fluorescein-konjugierter monoklonaler Maus IgG; bindet an ein Caspase gespaltenes Epitop des humanen Cytokeratin 18; zum Apoptosenachweis | M30Cyto Death Kit, Roche, Mannheim |
|------------------|---|------------------------------------|

2.1.7.2 Sekundärantikörper

| Bezeichnung | Eigenschaften | Referenz |
|---|---|------------------|
| Ziege-α-Kaninchen-IgG, FITC , (Fluoresceinthiocyanat) | Erkennt den (H + L) Bereich des Kaninchen IgG | Dianova, Hamburg |
| Ziege-α-Schwein-IgG, FITC | Erkennt den (H + L) Bereich des Schweine IgG | Dianova, Hamburg |
| Esel-α-Kaninchen-IgG, Cy5TM konjugiert | Erkennt den (H + L) Bereich des Kaninchen IgG | Dianova, Hamburg |
| Ziege-α-Maus-IgG, FITC | Erkennt den (H + L) Bereich des Maus IgG | Dianova, Hamburg |

2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|----------------------------|
| ABI PRISM TM Genetic Analyzer | Applied Biosystems, USA |
| Cryogefäße | Nunc, Dänemark |
| Gelelektrophoresekammer | Biometra, Göttingen |
| DNA-Längenstandards | NE Biolabs, Schwalbach |
| Fluorometer TD-360 | Turner Design, USA |
| Kulturgefäße | Nunclon, Dänemark |
| | Sarstedt, Nümbrecht |
| Laborzentrifuge | Sorvall, USA |
| Magnetrührer | Jahnke & Kunkel, Staufen |
| Objektträger/ Deckgläschen | Menzel/ Roth, Karlsruhe |
| Chamber slides Kunststoff | Nalge Nunc National, USA |
| Parafilm | American National Can, USA |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|-------------------|--------------------------|
| Thermocycler | Greiner, Nürtingen |
| Tischzentrifuge | Biometra, Göttingen |
| Vortexer | Heraeus Instruments, USA |
| Wasserbad | Jahnke & Kunkel, Staufen |
| Zentrifugengefäße | Haake, Karlsruhe |
| | DuPont NEN, USA |
| | Falcon, USA |

2.1.9 Kits

| | |
|--|------------------------------------|
| BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix with AmpliTaq®-T Vector Systems | PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| DNeasy Tissue Kit | QIAGEN, Hilden |
| Effectene Transfection Reagent | QIAGEN, Hilden |
| Expand High Fidelity PCR Kit | Roche, Mannheim |
| Dual Light Kit | Promega |
| TOPO-TA Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | QIAGEN, Hilden |
| QIAmp Ultra Sense Virus Kit | QIAGEN, Hilden |
| QIAprep Säulen Mini-Kit | QIAGEN, Hilden |
| QIAquick PCR Purification Kit | QIAGEN, Hilden |
| QIAquick Gel Extraction Kit | QIAGEN, Hilden |
| M30Cyto Death, Fluorescein | Roche, Mannheim |
| In Situ Cell Death Detection Kit, TMRred | Roche, Mannheim |

2.1.10 Software

ABI PRISM™ DNA Sequencing Analysis

Applied Biosystems, USA

Auto Assembler™

Applied Biosystems, USA

Factura™

Applied Biosystems, USA

MacVector™

International Biotechnologies, GB

PrimerPremier™
Kanada

PREMIER Biosoft International,

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Blutlymphozyten und Makrophagen mittels Ficoll Gradient

Blutlymphozyten und Makrophagen wurden aus ca. 10-40 ml Frischblut von Affe, Mensch und Schwein isoliert. Das Blut wurde dabei steril entnommen und in Heparinröhrchen aufgefangen. Anschließend wurde das Frischblut mit 5-10 ml PBS (je nach Gesamtvolumen) verdünnt. 5-15 ml Ficoll wurden in einem 50 ml Greiner Spitzbodenröhrchen vorgelegt und das verdünnte heparinisierte Frischblut vorsichtig auf das Ficoll aufgegeben. Die nachfolgende Zentrifugation erfolgte bei 1800 rpm in der Heraeus Varifuge 3.0R und 19°C für 40 min. Anschließend wurden die Zellen, die sich an der Grenzschicht zwischen Ficoll und Blutplasma angereichert hatten, steril entnommen, in ein frisches Greinerröhrchen gegeben und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 1800 rpm in der Heraeus Varifuge 3.0R zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, die Zellen wieder in Suspension gebracht und das Volumen mit PBS erneut auf 50 ml aufgefüllt. Eine weitere Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 1200 rpm. Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt, wobei die Zentrifugation bei 1100 rpm durchgeführt wurde. Daraufhin wurde das PBS abgegossen und die Zellen in 20 ml RPMI aufgenommen und im Casey Counter gezählt.

2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Für die Transfektions- und Infektionsstudien wurden folgende verschiedene humane und nicht-humane Zellen verwendet, darunter adhärente Zellen, Suspensionszellen und primäre Blutlymphozyten bzw. Makrophagen:

Tab. 2.6: Im Rahmen der Arbeit verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Gewebe | Spezies | Wuchsform |
|--------------------|--|---------|---------------|
| Chang Liver | Leber (<i>ATCC CCI-13</i>) | Mensch | adhärent |
| F1 | Amnion (<i>ATCC CCL-62</i>) | | |
| 293 | Foetale Niere (<i>ATCC CRL-1573</i>) | | |
| Hep2 | Leber (<i>ATCC HB-8065</i>) | | |
| RH | Niere (RKI, Berlin) | | |
| CaCo | Darm (<i>ATCC HTB-37</i>) | | |
| Hela | Cervix Karzinom (<i>ATCC CCL-2</i>) | | |
| Ma23 | Lungenfibroblast (RKI, Berlin) | | |
| Rd | Mund Karzinom (RKI, Berlin) | | |
| Wi2.NS.6TG | Milz (<i>ECACC 93031001</i>) | Mensch | in Suspension |
| THP1 | Monozyten (<i>ATCC TIB-202</i>) | | |
| Jurkat | B-Lymphozyten (<i>ATCC TIB-152</i>) | | |
| Molt4 | T-Lymphozyten (<i>ATCC CRL-1582</i>) | | |
| C8166 | T-Lymphozyten (<i>ECACC 88051601</i>) | | |
| CCRF-CEM | T-Lymphozyten (<i>ATCC CCL-119</i>) | | |
| U937 | Monozyten (<i>ATCC CRL-1593</i>) | | |
| H9 | T-Lymphozyten (<i>ATCC HTB-176</i>) | | |
| PBMCs | PBMCs | | |
| Vero | Niere (<i>ATCC CCL-81</i>) | Affe | adhärent |
| PG-4 | Fibroblasten (<i>ATCC CRL-2032</i>) | Katze | |
| CTL-6 | Fibroblasten (RKI, Berlin) | Maus | |
| RAT-2 | Fibroblasten (RKI, Berlin) | Ratte | |
| L23/L52 | B-Lymphozyten (RKI, Berlin) | Schwein | In Suspension |
| PS/PK | Niere (<i>ATCC CCL-33</i>) | | adhärent |

2.2.2.1 Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden im Heraeus Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂ Zufuhr von 5 % in Schalen oder Flaschen aus Kunststoff inkubiert. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Dabei wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und frisches auf Raumtemperatur erwärmtes Medium auf die Zellen gegeben.

Bei einem konfluenten Zellwachstum wurden die Zellen 1:10 verdünnt. Hierfür wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 1-3 ml (abhängig von der Größe des

Kulturgefäßes) Trypsinlösung gewaschen. Nach einer Inkubationszeit von 7 min im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen, verdünnt und bei Bedarf auf mehrere Kulturgefäße umgesetzt.

2.2.2.2 Suspensionszellen

In Suspension befindliche Zellen wurden unter gleichen Bedingungen inkubiert wie adhärente Zellen. Im Gegensatz zu diesen jedoch wurden die Zellkulturflaschen mit Suspensionszellen im Brutschrank stehend aufbewahrt. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:10 verdünnt. Dabei wurden 22,5 ml der Suspension verworfen und die restlichen 2,5 ml mit 22,5 ml frischem Medium aufgefüllt.

2.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen großen 600 ml Kulturflasche mit Medium gewaschen, abtrypsiniert und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei 800 rpm in einer Heraeus Varifuge 3.0R für 4 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden nachfolgend mit 5 ml eines Gemisches bestehend aus 3,5 ml DMEM, 1 ml FKS und 0,5 ml DMSO in Lösung gebracht und gleichmäßig auf 6 Kryoröhrchen verteilt und für drei Tage bei -20°C eingefroren. Nach diesen drei Tagen erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Für das Auftauen von eingefrorenen Zellen wurde ein Kryoröhrchen dem flüssigem Stickstoff entnommen und sofort in warmes Wasser gestellt. Die in einem Schutzgefäß aufgetaute Zellsuspension wurde anschließend in eine Kulturflasche pipettiert und mit frischem auf Raumtemperatur erwärmtem Medium aufgefüllt und bei 37°C im begasten Brutschrank inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von DNA

Die in dieser Arbeit mittels Konsensusprimer-PCR untersuchten humanen Proben umfassen verschiedene Probenarten von unterschiedlichen Patienten- und Probandengruppen. Untersucht wurde Frischblut, Serum, Urin und in Paraffin eingebettetes Gewebe. Um die DNA als Matrize für die Konsensusprimer-PCR einsetzen zu können, musste diese möglichst frei von potenziellen PCR-Inhibitoren sein. Zur Isolierung von DNA wurde der DNeasy Tissue Kit (QIAgen, Hilden) für Blutzellen, Zellkulturen und in Paraffin eingebettetes Gewebe und für Serum und Urin der Virus Ultrasens Kit von QIAgen eingesetzt.

2.3.1.1 Isolation von DNA aus Gewebe

Dem QIAgen Protokoll folgend wurden für die Aufarbeitung 25 mg zerkleinertes Gewebe (bzw. 10 mg Milz) mit 180 µl ATL-Puffer versetzt. Für die Lyse der Zellen wurden 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt, das Gemisch gevortext und bei 55 °C für 1-3 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine RNase-Behandlung mit 4 µl RNase (100 mg/ml). Die Probe wurde gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer der Probe zugeführt und bei 70 °C für 10 min inkubiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 200 µl Ethanol. Das Gesamtgemisch wurde dann zur Adsorption der DNA auf eine Silicagelsäule gegeben, für 1 min bei 8000 rpm in einer Heraeus Tischzentrifuge zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit zunächst Puffer AW1 bei 8000 rpm für 1 min und danach mit AW2 bei 14000 rpm für 3 min, um überschüssiges Salz zu entfernen. Dann wurde die DNA mit 200 µl AE-Puffer eluiert.

2.3.1.2 Isolation von DNA aus Blut

Für die Isolation von DNA aus Blut wurde ca. 10 ml heparinisiertes Frischblut verwendet. Dieses wurde in 10 ml Heparinröhrchen für 10 min bei 1800 rpm in einer Heraeus Varifuge 3.0R zentrifugiert, um eine Phasenbildung des Blutes zu erreichen. Die mittlere etwa 5 mm dicke Zellschicht zwischen Serum und Blutplasma wurde steril entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Von dieser Zellsuspension wurden 200 µl für die DNA-Isolation

verwendet. Im Gegensatz zur oben erwähnten DNA-Isolation aus Gewebe, wurden zunächst 20 µl Proteinase K im Eppendorfröhrchen vorgelegt und anschließend 200 µl Zellsuspension dazugegeben. Nachfolgend wurden 200 µl Puffer AL hinzugefügt und das Gemisch bei 56 °C für 10 min inkubiert. Alle darauf folgenden Schritte wurden durchgeführt wie bereits oben beschrieben.

2.3.1.3 Isolation von DNA aus getrocknetem Taubenfilterblut

Um das Taubencircovirus PiCV *in vivo* nachzuweisen, wurde ein etwa daumennagelgroßer Tropfen Frischblut der zu untersuchenden Taube auf steriles Filterpapier getropft, getrocknet und nach Bedarf aufgearbeitet. Für die DNA-Isolierung wurde ein etwa 1 cm Ø großes Stück des blutdurchtränkten Filters steril ausgeschnitten und in ein mit 210 µl bidestilliertes Wasser gefülltes Reaktionsgefäß gegeben und für 1 h inkubiert. Nach 30 und 60 min wurde das Reaktionsgefäß jeweils bei 14000 rpm in einer Haereus Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL und eine Inkubation bei 60 °C für 45 min. Alle 15 min wurden die Proben zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurden die Reaktionsgefäße gevortext und erneut zentrifugiert. Zuerst wurde die flüssige Phase auf eine QIAgen Silicagelsäule gegeben und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und nachfolgend das Filterpapier. Das Waschen der Säule erfolgte wie unter 2.3.1.1 beschrieben, jedoch wurde der Waschschrift zweimal durchgeführt. Das Eluieren der DNA wurde durchgeführt mit 200 µl auf 70 °C vorgewärmten Tris-Puffer (pH: 8,4; 10 mM).

2.3.1.4 Isolation von DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

Hierfür wurden humane Lymphknotenproben verwendet, die in Paraffin eingebettet waren. Um das Gewebe zu bearbeiten, wurden von den Paraffinblöcken zwei etwa 20 µm dicke Scheiben mit einem Mikrotom abgeschnitten und in Eppendorfröhrchen überführt. Mittels Zugabe von 1200 µl Rotihistol® wurde das Paraffin herausgelöst. Nach einem 5 min Zentrifugationsschritt bei höchster Geschwindigkeit in der Haereus Tischzentrifuge, wurde der Überstand verworfen und 1200 µl absoluter Alkohol hinzugefügt und nochmals 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurden die offenen Röhrchen bei Raumtemperatur unter dem Abzug für 15 min inkubiert, um das restliche Ethanol verdunsten zu lassen. Das Pellet konnte dann in 180 µl ATL-Puffer aufgenommen werden; die Aufarbeitung wurde dann fortgeführt wie unter 2.3.1.1 beschrieben.

2.3.1.5 Isolation von DNA aus Zellkulturen

Für die Gewinnung von DNA aus Zellkulturen wurden etwa 5×10^6 Zellen von ihrem Kulturgefäß abtrypsiniert, in ein Eppendorfröhrchen überführt und bei 800 rpm für 5 min in einer Haereus Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl AL-Puffer aufgenommen. Weiterhin wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt und das Gemisch bei 70 °C für 10 min inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden so durchgeführt wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

2.3.1.6 Isolation von DNA aus Serum und Urin

Für die Isolierung von DNA aus Serum und Urin wurde ein noch nicht kommerziell erhältlicher Kit von QIAGEN verwendet (Quiamp Ultra Sens Virus Kit), mit dem virale DNA aus zellfreien Medien isoliert werden kann. Dabei bildet der Puffer AC einen Komplex mit den Nukleinsäuren, diese Komplexe können bei geringen rpm-Zahlen pelletiert und anschließend wieder resuspendiert werden. Danach erfolgt die Bindung der DNA an eine Silicagelsäule.

Für die Durchführung der DNA-Isolation wurden 1 ml auf Raumtemperatur temperiertes Serum bzw. Urin verwendet und in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Weiterhin wurden dann 0.8 ml Puffer AC hinzugefügt und 5,6 µl Carrier-RNA in den Deckel des Zentrifugenröhrchens pipettiert. Nach Schließen des Deckels wurde das Röhrchen geschwenkt und dann 10 sec gevortext. Es folgte eine Inkubation von 10 min. Anschließend wurden die Proben bei 3600 rpm in einer Sigma 3K30 für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 300 µl auf 60 °C temperierter Puffer AR und 20 µl Proteinase K hinzugefügt. Durch das folgende Durchmischen wurde das entstandene Pellet komplett resuspendiert. Danach wurden die Proben für 10 min bei 40 °C in einem Wasserbad inkubiert und währenddessen regelmäßig gevortext. 300 µl Puffer AB wurden hinzugegeben, die Probe wurde gemischt und schließlich auf eine Silicagelsäule pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 1600 rpm in einer Sigma 3K30 für 1 min. Die nachfolgenden Waschschrte wurden genauso durchgeführt, wie bereits unter 2.3.1.1 beschrieben. Das Eluieren der DNA wurde mit Puffer AVE vorgenommen. Hierfür wurden 30 µl auf die Membran der Säule pipettiert und bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde wiederholt.

2.3.2 Fluorometrische Quantifizierung von DNA Konzentrationen

Die Konzentration von DNA wurde fluorometrisch bestimmt. Die Methode beruht auf der Bindung eines Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoffes (Hoechst 33258) an doppelsträngige DNA. Für die Messung musste zunächst frischer Messpuffer angesetzt werden. Dazu wurden 10 ml 10 x TNE mit 90 ml H₂O und 10 µl Hoechst 33258 Lösung versetzt. Der Messpuffer wurde gemischt und auf Raumtemperatur gebracht. Die Messung der Proben erfolgte im Fluorometer TD360 (Turner Design, Sunnyvale, USA). Um das Gerät zu eichen, wurden zunächst 2 ml Messpuffer in einer Plastik-Küvette vorgelegt und als Nullwert vermessen. 2 µl einer Kalbsthymus DNA-haltigen Lösung (120 ng/µl) wurden zum Puffer hinzugegeben, gevortext und die Thymus-Probe als Eichwert vermessen. Anschließend wurde die Probe verworfen und ein erneuter Nullabgleich vorgenommen. Nach Zugabe von 2 µl der zu bestimmenden DNA und kurzem Durchmischen wurde die Probe vermessen. Die ermittelte Konzentration wurde vom Gerät in ng/µl angegeben.

2.3.3 Konstruktion von Plasmiden

2.3.3.1 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden zur Herstellung von DNA-Fragmenten durchgeführt oder dienten der Analyse von Plasmid-DNA. Hierfür wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, bakterieneigene Enzyme, die doppelsträngige DNA erkennen und sequenzspezifisch spalten können. Dabei hydrolysieren sie Phosphodiesterbindungen eines DNA-Moleküls. Restriktionsendonukleasen unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus.

Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden üblicherweise zwischen 100 und 500 ng DNA eingesetzt. Folgte dem Restriktionsverdau jedoch eine präparative Gelelektrophorese, wurden bis zu 50 µg DNA eingesetzt.

Die Salz- und Pufferbedingungen wurden nach Angabe des Herstellers (New England Biolabs) gewählt. Bei Restriktionsansätzen mit zwei verschiedenen Enzymen richtete sich die Wahl des Puffersystems nach den Kompatibilitätstabellen des Herstellers; d.h. es wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine Aktivität von mindestens 50 % hatten und keine *Star*-Aktivität auftreten sollte (bei der sogenannten „*Star*-Aktivität“ schneidet ein Restrik-

tionsenzym neben der definierten Erkennungssequenz weitere DNA-Sequenzen, die der definierten Erkennungssequenz ähneln). Stand kein geeignetes Puffersystem für einen Doppelverdau zur Verfügung, wurden die Verdau nacheinander folgend durchgeführt.

Die notwendige Menge an eingesetztem Restriktionsenzym richtete sich nach den Aktivitätsangaben (U/ μ l) des Herstellers und war abhängig von der gewünschten Inkubationszeit. Wegen des Glycerolgehaltes der Enzymlösung wurde darauf geachtet, dass der Volumenanteil an Restriktionsenzymlösung 10 % nicht überschritt. Üblicherweise wurde das 2-5 fache der rechnerisch benötigten Menge des jeweiligen Restriktionsenzymes eingesetzt. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte bei 37 °C und dauerte in der Regel 1-16 Stunden.

Die abgeschlossenen Restriktionsverdau wurden entweder mit 1/5 Volumen DNA-Beladungspuffer versehen und gelelektrophoretisch analysiert oder sie wurden für Ligationsansätze verwendet.

2.3.3.2 Längenauftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Für die Auftrennung im Agarosegel wurde 0,8-2 %ige Agarose eingesetzt. Als Laufpuffer diente dabei 2 x TBE-Puffer. Die Elektrophoresen wurden horizontal bei einer konstanten Spannung von 90 V durchgeführt. Der Agarose und dem Laufpuffer wurden 400 ng/ml Ethidiumbromid beigefügt; den DNA-Proben wurden vor dem Auftragen 1/5 Volumen DNA-Beladungspuffer zugegeben. Die notwendige Laufzeit bis zur ausreichenden Auftrennung der Proben konnte anhand des Farbmarkers Bromphenolblau im Beladungspuffer oder mittels einer UV-Lampe und direkter Beobachtung des Bandenmusters ermittelt werden. Zur Dokumentation der abgeschlossenen Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Tisch mit einer Digitalkamera (Intas, UV-Systeme) fotografiert. Die Bestimmung der Größe und der Konzentration (Banden) erfolgte durch einen Vergleich mit den Banden eines DNA-Längenstandards (λ /Hind III und/oder ϕ X/Hae III), welcher zuvor neben den DNA-Proben auf das Gel mit aufgetragen worden war. Bei diesen Längenstandards ist die Größe und Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente bekannt.

2.3.3.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Abtrennung spezifischer DNA-Fragmente von anderen Nukleinsäuren und Substanzen, die eine etwaige folgende Reaktion negativ beeinflussen können, wurden je nach Beschaffenheit der DNA zwei unterschiedliche Methoden angewendet.

2.3.3.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um ein DNA-Fragment aus dem Gel zu isolieren, wurde ein Gel-Extraktions-Kit (QIAgen, Hilden) verwendet. Extraktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente basierte dabei auf der Löslichkeit von Agarose und der selektiven, quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren (bis zu 10 µg) an eine Silicagelmembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während andere Bestandteile die Membran ungebunden passieren können.

Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Auftrennung der DNA in einem 1 %igem Agarosegel wie unter 3.2.3.2 beschrieben mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“. Dabei musste das zu extrahierende DNA-Fragment zunächst unter einer UV-Lampe mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und gewogen werden. Das Gewicht der ausgeschnittenen Banden betrug in der Regel 150-300 mg. Pro 100 mg Gelstück wurden dann 300 µl Puffer QG zugegeben. Anschließend wurde das Röhrchen im Wasserbad auf 50 °C für ca. 10 min inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurde die Probe alle 3 min gemischt. Nach der Inkubation wurden dem Röhrchen pro 100 mg 100 µl Isopropanol zugeführt, die Probe wurde anschließend gemischt und dann auf eine QIAquick-Zentrifugensäule in einem 2 ml Auffangröhrchen gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei 13000 rpm für 1 min in einer Heraeus Tischzentrifuge. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule erneut auf das Auffanggefäß gesetzt. Anschließend wurde 750 µl PE Puffer auf die Säule gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde wieder 1 min zentrifugiert. Zur Entfernung letzter Reste des Puffers PE wurde nochmals wie bereits oben beschrieben zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde die Säule dann auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und 50 µl Elutionspuffer EB (10 mM TrisCl, pH 8,5) in die Mitte der Silicagelmembran pipettiert. Nach 1 min Inkubationszeit erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 min. Die nunmehr eluierte DNA konnte sowohl für Restriktionsverdaus als auch für Ligationen verwendet werden.

2.3.3.3.2 Aufreinigung von DNA nach PCR

Diese Art der Aufreinigung stellt eine Variation der oben angegebenen Gel-Extraktion dar und dient dazu, DNA von Enzymen, Salzen oder Oligonukleotiden zu reinigen. Mit dem PCR-Aufreinigungs Kit der Firma QIAGEN wurde doppelsträngige DNA einer Länge von 100 bp-10 kb aufgereinigt.

Zunächst wurde der Probe das 5-fache Volumen an Puffer PB zugesetzt und der Ansatz kurz gemischt. Die Probe wurde dann auf eine QIAquick-Zentrifugationssäule pipettiert. Die anschließenden Wasch- und Elutionsschritte erfolgten danach genauso wie bereits unter 2.3.3.3.1 beschrieben.

2.3.3.4 Ligation von DNA

Zentraler Vorgang einer Klonierung ist die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit einer T4-DNA-Ligase. Dabei ist die häufigste Anwendung die Integration eines Inserts in einen linearisierten Vektor. Die Ligation erfordert entweder glatte Enden (blunt ends) oder kompatible überhängende Enden (sticky ends). Kompatible Enden sind gegeben, wenn die zu verbindenden Enden aus einem Verdau mit dem gleichen Restriktionsenzym hervorgegangen sind, bzw. aus einem Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen resultieren, welche gleichartige überstehende Enden produzieren. Eine gerichtete Klonierung, also eine gezielte Orientierung des Inserts im Vektor kann erreicht werden, wenn jede Komponente (Insert und Vektor) unterschiedliche Enden trägt, die kompatibel zu den Enden der anderen Komponenten sind.

Für die Durchführung einer effizienten Ligation, spielt das stöchiometrische Verhältnis von Vektor und Insert eine große Rolle. Im Falle der gerichteten Ligation muss das Verhältnis 1:1 betragen, während bei einer „blunt-end“ Ligation ein Überschuss an Insert erforderlich ist (Vektor:Insert = 1:3-1:5).

Die eigentliche Ligationsreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl. Hierfür wurde der DNA-Lösung 2 µl 10 x Ligase-Puffer, 400 U T4-DNA-Ligase, Vektor und Insert in gewünschtem Verhältnis und bidestilliertes Wasser zugeführt. Die Ansätze wurden über Nacht in einem Thermoblock bei 16 °C inkubiert und anschließend direkt für die Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen verwendet oder aufgereinigt und für Trans-

fektionsansätze vorbereitet.

2.3.3.5 Transformation von Bakterien

Für die Vermehrung von klonierten DNA-Fragmenten wurden Plasmide als Vektoren eingesetzt, die sich episomal in Bakterien vermehren können. Diese Plasmide mussten für ihre Amplifikation in einen geeigneten *E. coli*-Stamm übertragen werden (Transformation). Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet (siehe Material 2.1.4). Für die Transformation wurden die *E. coli*s in einen Zustand der Hochpotenz gebracht. Hierfür wurde der Kit "Z-Competent *E. coli* Transformation Buffer Set" der Firma Zymo Research verwendet.

Für die Präparation von Z-Kompetenten Zellen wurden zunächst DH5 α -Zellen auf einem LB-Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie in 5 ml frisches LB-Medium überführt und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden etwa 0,5 ml in 50 ml SOB-Medium überführt und bei 20-25 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Bakterienkultur eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 erreichte. Nach Erreichen der notwendigen OD wurden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4000 rpm in der Sorvall RC 5C plus für 6 min bei 0-4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml eiskaltem 1 x Wasch-Puffer resuspendiert um danach erneut pelletiert zu werden. Dann wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml eiskaltem 1 x Competent-Puffer resuspendiert und in 120 μ l Aliquots auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Transformation (Dagert and Ehrlich, 1979; Hanahan, 1983) von kompetenten DH5 α -Zellen erfolgte in einem Volumen von 100 μ l. Hierfür wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, in ein Eppendorfgefäß überführt und 1-5 μ l (je nach Konzentration) der DNA hinzugegeben und die Probe vorsichtig gemischt. Nach etwa 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden 20-50 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Selektionsmedium, das in der Regel 100 μ g/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Trugen die verwendeten Plasmide eine andere Antibiotikaresistenz, so wurden entsprechende Platten benutzt.

2.3.3.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung von frisch erzeugten PCR-Fragmenten wurde der TOPO™ TA Cloning Kit Version N der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Kit beruht auf folgendem Prinzip: Die *Taq* Polymerase weist eine terminale Transferase Aktivität auf, durch die ein Deoxyadenosin an die 3'-Enden der PCR Produkte angehängt wird. Der bereits linearisierte TOPO TA Cloning Vektor pCR2.1 hat demgegenüber an seinen 3'-Enden einen Deoxythymidin Überhang und ist zusätzlich mit Topoisomerase I gekoppelt. Dadurch wird eine schnelle und effiziente Ligation von PCR-Fragmenten in den Vektor ermöglicht.

In der Regel wurden folgende Ansätze pipettiert:

| | |
|----------------------------------|----------|
| PCR-Produkt | 0,5-4 µl |
| Bidest. Wasser | ad 5 µl |
| Salzlösung, TOPO™ TA Cloning Kit | 1 µl |
| Vektor pCR2.1 | 1 µl |
| Gesamtvolumen | 7 µl |

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert und dann auf Eis gestellt. Zeitgleich wurden die One Shot® Chemically Competent *E. coli* auf Eis aufgetaut. 2 µl des Reaktionsansatzes wurden zu den Zellen hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 30 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterworfen und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Der Probe wurden 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium zugeführt; die Zellen wurden nachfolgend bei 37 °C für 1 Stunde horizontal rotierend (bei 200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension auf vorgewärmte LB-Agarplatten (Ampicillin 100 mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Isolierung der Plasmide erfolgte wie unter 2.3.3.7 beschrieben.

2.3.3.7 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

Zur Kontrolle der in der Klonierung entstandenen Plasmidkonstrukte wurden analytische

Plasmidisolierungen durchgeführt. Hierfür erfolgte die Präparation der Plasmide aus Minikulturen. Dazu wurde 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) mit einer Bakterienkolonie aus der Transformation beimpft. Die Kulturen wurden über Nacht, bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm, inkubiert. Nachdem diese Kulturen über Nacht ihre stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, erfolgte die Aufarbeitung mittels eines Kits der Firma QIAGEN (QIAprep 8 Plasmid Kit). Die Funktionsweise dieses Kits basiert auf der Methode der modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979), sowie der Adsorption von DNA an Silicagelmembranen unter hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Zunächst wurden von den Übernachtskulturen 1,5 ml abgenommen und in ein Eppendorfröhrchen pipettiert. Diese wurden bei 13000 rpm für 1 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Weiterhin wurden 250 µl Lysis-Puffer P2 hinzugefügt, 5 min inkubiert und danach 500 µl Puffer N3 zugegeben. Nach Zugabe des Puffers N3 konnte eine Trübung der Lösung beobachtet werden. Die Röhrchen wurden für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert; dabei bildete sich ein weißes Pellet. Der Überstand wurde auf eine QIAprep 8 Strip Säule aufgetragen, die sich in einer Vakuumapparatur befand. Durch Anlegen eines Vakuums wurde die DNA-haltige Probe durch die Säulen gesaugt, dabei band die Plasmid-DNA an die Silicagelmembran. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule 2 x mit je 1 ml Puffer PE gewaschen, so dass überschüssiges Salz entfernt werden konnte. Nach dem Waschen wurde für weitere 5 min ein Vakuum an die Säule angelegt, um Reste des Waschpuffers PE zu entfernen. Die Auslauföffnung wurde mit einem Stück Zellstoff abgetupft, um die letzten Reste PE Puffer zu entfernen; dann wurde die Plasmid-DNA mit zunächst 50 µl bidestilliertem Wasser und 120 µl Puffer EB eluiert.

2.3.3.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Nucleinsäuren, also die Bestimmung der Nucleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls, wurde nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Zur Sequenzbestimmung eines DNA-Stranges wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit nur einem Oligonucleotid durchgeführt. Dabei bewirkt der Einbau von 2'-, 3'-Didesoxynucleotiden (ddNTPs), die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren, einen Kettenabbruch. Diese resultieren in Fragmenten, die ein einzelnes fluoreszierendes Nucleotid am 3'-Ende tragen. Die Auftrennung der Fragmente in einer Gelelektrophorese

zeigt eine Leiter, anhand derer die Sequenz der jeweiligen Basen ermittelt werden kann. In dieser Arbeit wurden zur Erzeugung und Markierung der PCR-Fragmente das ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet.

Zur Sequenzierung wurden 250-500 ng Plasmid-DNA mit 10 pmol eines Sequenzier-Primers und zwischen 2 und 4 µl Big Dye (Perkin Elmer) in 10 µl bidestilliertem Wasser verdünnt. Der Sequenzierungsansatz wurde unter folgenden Bedingungen vorgenommen:

25x 96 °C 10 sec

 55 °C 5 sec

 60 °C 4 min

Anschließend wurde die Probe mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 10 µl NaAc (3M, pH 5,3) und 250 µl absolutem Ethanol gefällt und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 1,5 µl Formamidpuffer aufgenommen und auf einem automatischen DNA-Sequenzer (Perkin Elmer) durch Acrylamidgelelektrophorese ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Ein Laser detektierte während der Elektrophorese die Farbstoffe der einzelnen Fragmente. Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit Hilfe der Software „Factura“ und „Sequencing Analysis 3.0“ (ABI PRISM/Perkin Elmer).

2.3.4 Anwendungen der Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

2.3.4.1 Amplifikation spezifischer Klonierungsfragmente mittels PCR

Die Methode der Polymerase Ketten Reaktion (Mullis et al., 1986) bietet die Möglichkeit, einen DNA-Bereich zwischen zwei bekannten Regionen zu amplifizieren. Darüber hinaus können über Auswahl geeigneter Primer, die an ihren Enden Restriktionsschnittstellen tragen, Schnittstellen in das zu amplifizierende Insert eingefügt werden, um selbiges gerichtet in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eines Vektors zu integrieren.

Für die PCR wurden jeweils zwei Oligonukleotide als Primer benötigt, die jeweils zu dem (+)- bzw. dem (-)-Strang komplementär sind. Weiterhin wurde *Expand High Fidelity* DNA-

Polymerase (Roche Diagnostics) benutzt, da diese über eine 3`-5` Exonukleaseaktivität verfügt. Die Polymerase kann falsch eingebaute Nukleotide erkennen und diese wieder entfernen (Korrekturlesefunktion) und damit die Rate an falsch eingebauten Nukleotiden senken.

Die PCR-Ansätze enthielten:

- 200 pg der zu amplifizierenden DNA
- je 50 pg „sense“ und „antisense“ Primer
- 2 mM MgCl₂
- 1 x *Expand High Fidelity* PCR Puffer (3,5 U/μl)
- 200 μM dNTP`s
- 0,7 U *High Fidelity* DNA-Polymerase
- bidestilliertes Wasser ad 25 μl

Die PCR-Ansätze wurden in einem Thermocycler des Typs GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer) amplifiziert. Die Synthesedauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Folgende Parameter stellen einen Anhaltspunkt für das Syntheseprotokoll dar:

| | | | |
|------|---------|-------|---------------------------|
| 1 x | 2,5 min | 95 °C | initiale Denaturierung |
| 25 x | 20 sec | 95 °C | Denaturierung |
| | 20 sec | 55 °C | Binden der Primermoleküle |
| | 45 sec | 72 °C | Elongation |
| 1 x | 10 min | 72 °C | Strangauffüllung |
| | ∞ | 4 °C | |

Nach der Synthese wurden die PCR-Produkte in einem 1 %igem Agarosegel analysiert und das benötigte DNA-Fragment gegebenenfalls aus der Agarose extrahiert (2.3.3.3.1) oder

direkt aufgereinigt (2.3.3.3.2).

2.3.4.2 Quantitative-Echtzeit-PCR

Um die Anzahl viraler DNA-Genome im Zellmedium nach Infektion der Zellen zu bestimmen, wurde die Quantitative Echtzeit-PCR angewendet. Die quantitative PCR wurde mittels des TaqManTM-Systems der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Die grundlegende Reaktion, auf der dieses System basiert, ist im Folgenden beschrieben. Nach der Denaturierung binden Primer und Fluoreszenzsonde in den zu amplifizierenden Bereich der Matrize. Die Besonderheit der Sonde ist eine Farbstoffmarkierung am 3'-Ende (Quencher) und eine weitere am 5'-Ende (Reporter). Ist die Sonde intakt, sorgt die räumliche Nähe zwischen Reporter- und Quencher-molekül für eine Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporters. Der sich vom Vorwärtsprimer aus verlängernde DNA-Strang läuft dabei auf die gebundene Sonde zu und kollidiert mit dieser. Die in der Reaktion eingesetzte AmpliTaq GoldTM DNA-Polymerase besitzt eine Nukleaseaktivität, welche die Sonde, die den Zugang zur Matrize blockiert, verdaut. Der Abbau der Sonde führt zu einer räumlichen Trennung der beiden an die Sonde gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe und resultiert somit in einem Anstieg der Reporter-Fluoreszenz. Die Zunahme an Fluoreszenz ist proportional zu der Menge an freiem Reporter-Farbstoff. Sie wird detektiert und dient der Quantifizierung der Menge des eingesetzten Materials. Die Reste der Sonde werden durch das sich verlängernde Amplifikat verdrängt. Die Elongation führt zur Synthese vollständiger Amplifikate, welche im nächsten Zyklus als Matrize dienen können. Diese Reaktion wiederholt sich in jedem Zyklus der PCR.

Zum Eichen des Systems wurden als Matrize definierte Mengen eines Plasmids eingesetzt, das den zu detektierenden DNA-Bereich enthielt. Die in den hier beschriebenen Versuchen verwendeten Sonden waren mit den Farbstoffen FAM und TAMRA gekoppelt und wurden mit Hilfe der Software *Primer Express Oligo Design* (Perkin-Elmer, Biosystems, Weiterstadt) erstellt. Außerdem wurde den Reaktionsansätzen ein dritter Fluoreszenzfarbstoff, Roxithromycin (Perkin-Elmer), als interne Kontrolle zugesetzt. Dieser Farbstoff diente als Standardabgleich zur Erstellung einer Nulllinie der Fluoreszenz.

Die TaqMan-Ansätze besaßen ein Volumen von 50 µl und enthielten 10 µl der Zellüberstände, mit einer finalen Verdünnung von 1:100. Außerdem wurde hinzugegeben 10 x Puffer ohne MgCl₂, 200 µM dNTPs, 6 mM MgCl₂, je 250 nM Vor- und Rückwärtsprimer,

100 nM Sonde, 1 μ M Roxithromycin und 1,25 U AmpliTaq Gold DNA-Polymerase.

Die Ansätze der Standardwerte enthielten statt cDNA-Proben zwischen 10 und 10^7 Kopien des Eichplasmids pIC1, zur Erstellung der Standardkurve von PCV1, bzw. pPCV2, zur Erstellung der Standardkurve von PCV2. Zusätzlich enthielten die Standards 50 ng Kalbsthymus-DNA, was der Stimulation des cDNA-Hintergrundes in den TaqMan-Ansätzen der Präparationen diene.

Die Konzentrationsstandards und die zu vermessenden Proben wurden gemeinsam in 96-Lochplatten prozessiert. Hierzu wurden die Proben in die Vertiefungen der Platte gegeben und diese anschließend mit einer optischen Folie verschweißt. Die Konzentration der DNA in den Proben wurde daraufhin während der PCR-Reaktion mit einem Fluoreszenz-Detektor vermessen. Folgende PCR-Parameter wurden standardmäßig gewählt:

| | | |
|------|--------------|------------------------------|
| 1 x | 95 °C 10 min | Aktivierung |
| 45 x | 95 °C 20 sec | Denaturierung |
| | 55 °C 20 sec | Binden der Primermoleküle |
| | 72 °C 20 sec | Elongation der DNA-Fragmente |

Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Auswertung mit einer speziellen Software.

2.3.4.3 PCV-Spezifische PCR

Um virale DNA in infizierten bzw. transfizierten Zellen zu detektieren, wurde eine PCV-spezifische PCR durchgeführt. Durch Auswahl geeigneter Primer konnte anhand der Größe der entstandenen Amplifikate gezielt zwischen PCV1 und PCV2 unterschieden werden.

Die PCR-Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 25 μ l. Als Matrize wurde DNA mit einer Konzentration von 150 ng/ μ l verwendet, die zuvor aus den transfizierten Zellen isoliert wurde (2.3.1.5). Außerdem enthielten die Ansätze 0,75 U *Taq* Polymerase, 1 x PCR Puffer ohne MgCl₂ (Applied Biosystems, Roche), 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, jeweils 1 μ M Primer 197/198 für die PCV1-Detektion bzw. 199/200 für den Nachweis von PCV2 und 5 % DMSO.

Die Ansätze wurden auf 500 µl PCR-8er Streifen der Firma Eppendorf verteilt und die PCR-Reaktion im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

| | | | |
|------|--------|---------------|---------------------------|
| 1 x | 12 min | 96 °C | initiale Denaturierung |
| 40 x | 20 sec | 96 °C | Denaturierung |
| | 20 sec | 55 bzw. 57 °C | Binden der Primermoleküle |
| | 45 sec | 72 °C | Elongation |
| 1 x | 10 min | 72 °C | Strangauffüllung |
| | ∞ | 4 °C | |

Nach Durchführung der Amplifikation konnten die PCR-Ansätze im Agarose-Gel analysiert werden.

2.3.4.4 Durchführung einer Kontroll-PCR

Die Kontroll-PCR wurde verwendet, um die aus Blut und Geweben isolierte DNA hinsichtlich des Vorhandenseins PCR-inhibitorischer Substanzen zu untersuchen. Die eingesetzten Primer detektieren *cytB*, das als Bestandteil der Atmungskette in jeder Zelle vorkommt. Nach Isolation der DNA und anschließender Durchführung der Test-PCR, wurden für weitere Untersuchungen nur solche Proben verwendet, die sich in der Test-PCR amplifizieren ließen und somit frei von interferierenden Substanzen waren. Eingesetzt wurde eine DNA-Konzentration von 150 ng. Die PCR-Bedingungen sind den Beschreibungen unter 2.3.4.3 zu entnehmen. Die Primerbindungstemperatur betrug 50 °C, das amplifizierte Fragment hatte eine erwartete Größe von 359 bp.

2.3.4.5 Etablierung einer PCR mit Konsensusprimern

Die Konsensusprimer-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um nach neuen Circoviren zu suchen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass ihre Primer an hochkonservierte Bereiche binden, die im *rep*-Gen aller bislang bekannten Circoviren des Genus *Circovirus* vorkommen. Zu diesen Bereichen gehören drei Domänen, die typisch sind für Enzyme, die

DNA-Replikation im Rolling-Circle-Mechanismus vermitteln und weiterhin ein dNTP-bindendes Motiv (Koonin und Ilyina, 1992; Koonin und Ilyina, 1993). Zunächst wurden die konservierten Bereiche durch einen Vergleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenzen der bekannten Circoviren identifiziert. Nachfolgend wurden Primermoleküle ausgewählt (Primer Premier, Biosoft International, Kanada). Zur Durchführung der Konsensusprimer-PCR wurden degenerierte Primer verwendet. Degenerierte Primer zeichnen sich durch eine Sequenzvariation in den sogenannten Wobble-Positionen aus und stellen somit ein Primergemisch dar. Diese Strategie nutzt die Tatsache aus, dass der genetische Code redundant ist und eine Aminosäure durch mehrere Basentriplets kodiert werden kann. Durch Einsatz von degenerierten Primern wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Oligonukleotide auch an die Genome von bislang unbekanntem Viren einer Virusfamilie binden, die in den konservierten Bereichen geringfügige Sequenzabweichungen aufweisen.

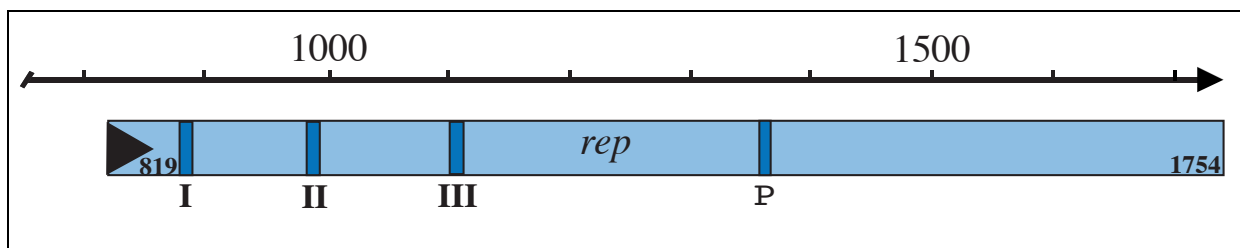


Abb. 2.1: Darstellung des *rep*-Gens von PCV1. Die dunkelblauen Balken markieren die konservierten Bereiche der Rolling-Circle Signatur (Domäne I, II und III) und den P-Loop.

Die Konsensusprimer-PCR wurde als gestaffelte PCR („nested-PCR“) durchgeführt, um die Sensitivität zu erhöhen und zu gewährleisten, dass es nicht zur Vervielfältigung von unspezifischen Amplifikaten kommt.

Eine nested-PCR wird in zwei Runden durchgeführt. Für die erste Runde wurden die Primer 174 und 175 eingesetzt, wobei das dabei erzeugte Amplikon eine Länge von etwa 400 bp hatte. Das in der zweiten Runde entstandene Amplifikat wurde dabei als Matrize für die 2. Runde eingesetzt. Dabei entstand ein Amplifikat mit einer Größe von etwa 250 bp.

| | | | | |
|-------------|-----|---|-----|--|
| | | 174 → | | |
| Rep-PCV1 | 1 | MPSKK-----SGPQP-----HKKRWV FTLNNH SSEEEKNKIRELPISLFDYFVCGEEGLEEGRTA HLQGF ANFAKKQTFNKVKWYFG | 75 | |
| Rep-PCV2 | 1 | MPSKKNGR--SGPQP-----HKKRWV FTLNNH SEDERKKIRELPISLFDYFIVGEEGNEEGRT HLQGF ANFVKKQTFNKVKWYLG | 78 | |
| Rep-Niagro | 1 | IPSKKEGS---G-----CRRWCV FTLNNH TDGEIEFVRS LGPDEFYAIIVGREKGEQG--T HLQGY FHFKNKKRLSALKKML- | 71 | |
| Rep-Bassami | 1 | MPSKEGS---G-----CRRWCV FTLNNH TDGEIEFVRS LGPDEFYAIIVGREKGEQG--T HLQGY FHFKNKKRLSALKKML- | 71 | |
| Rep CoCV | 1 | MAPCKPGSNPPKGRVSAEAGGARREARRPPREAAAKRWG FTLNNH TEEEIKSLETWLVSDPHYAIVGKEVGEQG--T HLQGF VHLKQKKRLPQLKQLF- | 98 | |
| | | * * * * * | | |
| | | ← 176 | | |
| Rep-PCV1 | 76 | ARCHIEKAKGTDQQNKE YCS KEGHILIECGAPRNQGRS DLSTAVSTLLETGSLVTVAEQFPVTVVFNFRGLAELLKVS GKMQRDWTAVHVIVGPPGC | 175 | |
| Rep-PCV2 | 79 | ARCHIEKAKGTDQQNKE YCS KEGNLLMECGAPRSQGRS DLSTAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTVVFNFRGLAELLKVS GKMQRDWTNVHVIVGPPGC | 178 | |
| Rep-Niagro | 72 | PRGHFERAKGSDADNEK YCS KEGDVILTLGIVARDG-HRAFDGAVAAVMSPGKMKEVAREFPDIYVRHGRGLHSLSLVGS SRP-RDFKTEVDVIYGP | 169 | |
| Rep-Bassami | 72 | PRAHFERAKGSDADNEK YCS KEGDVILTLGIVARDG-HRAFDGAVAAVMSPGKMKEVAREFPDIYVRHGRGLHSLSLVGS SRP-RDFKTEVDVIYGP | 169 | |
| Rep CoCV | 99 | KRAHWEKARGSDADNEK YCS KEGNVLLTLGIPAKGN-RSDLSEAVAAVKAGRAMTEVARDFSEIYVKYGRGLRDLKLLIGQQP-RDFKTEVIVITGP | 196 | |
| | | * * * * * | | |
| | | ← 177 | | |
| Rep-PCV1 | 176 | GKS QWARNFAPSDTYWKP SRNKWWDGYHGEEVVVLD DDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETKGGTVPF LARSILITSNQAPQEWYSS TAVPAVEALYRRI | 275 | |
| Rep-PCV2 | 179 | GKS KWAANFADPETTYWKP SRNKWWDGYHGEEVVVLD DDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETKGGTVPF LARSILITSNQTPLEWYSSA AVPAVEALYRRI | 278 | |
| Rep-Niagro | 170 | GKS RWAN--EQPGTKYYK-MRGEWWDGYDGEDVVLDD DDFYGWLPYCEMLRLCDRYPHKVPVKGAFVEFTSKRIIITSNKAPETWYKED--CDPKPLFRRF | 264 | |
| Rep-Bassami | 170 | GKS RWAN--EQPGTKYYK-MRGEWWDGYDGEDVVLDD DDFYGWLPYCEMLRLCDRYPHKVPVKGAFVEFTSKRIIITSNKPPETWYKED--CDPKPLFRRF | 264 | |
| Rep CoCV | 197 | GKS RWAA--DYPGSKFYK-MKGEWWDGYDHEVVIID DDFYGWLPFCELLRVTDRYPHKVPVKGAFVEFTSRVIVTNSP PDAWYSEER-CCVQALFRRI | 292 | |
| | | * * * * * | | |
| | | ← 175 | | |
| Rep-PCV1 | 276 | TTLQFWKTAGEQSTEVPEGRFEAVDPPCALFPYKINY | 312 | |
| Rep-PCV2 | 279 | TSLVFWKNATEQSTEE-GGQFVTLSPPCPEFPYIEINY | 314 | |
| Rep-Niagro | 265 | TRVWVYNI DKLEQVVRP-----DFLAHPINF | 289 | |
| Rep-Bassami | 265 | TRVWVYNI DKLEQVVRP-----DFLAHPINY | 289 | |
| Rep CoCV | 293 | NKWLVVNHDKFEDAPD-----CMKKYPINY | 317 | |
| | | * * | | |

Abb. 2.2: Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Rep-Proteine von PCV1, PCV2, BFDV (Rep-Bassami; Rep-Niagro) und PiCV (CoCV). Die farbigen Bereiche kennzeichnen die konservierten Regionen. Die schwarzen Pfeile zeigen das Primerpaar der ersten Runde; die grauen Pfeile das Primerpaar der zweiten Runde.

Zur Optimierung der Konsensusprimer-PCR wurden verschiedene Temperaturen für die Bindung des Primers an die Matrize getestet und die Mg^{2+} -Konzentration variiert (Daten nicht gezeigt). Diese Optimierung ergab eine Bindungstemperatur von 49 °C für die erste Runde und 53 °C für die zweite Runde und eine optimale Konzentration von 2 mM Mg^{2+} .

Die Konsensusprimer-PCR wurde standardmäßig mit folgenden Bedingungen eingesetzt. In 25 µl Gesamtvolumen lag die eingesetzte DNA-Konzentration bei 150 ng. Die PCR-Ansätze enthielten 0,75 U *Taq* Polymerase, 1 x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$ (Applied Biosystems, Roche), 2 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, jeweils 1 µM Primer 174/175 für die erste Runde bzw. 176/177 für die zweite Runde und 5 % DMSO. Nach Beendigung der ersten Runde wurde 1 µl der Ansätze als Matrize für die zweite Runde verwendet.

Die PCR-Ansätze sowohl der ersten als auch der zweiten Runde wurden in einem Thermocycler des Typs GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer) nach folgendem Protokoll amplifiziert:

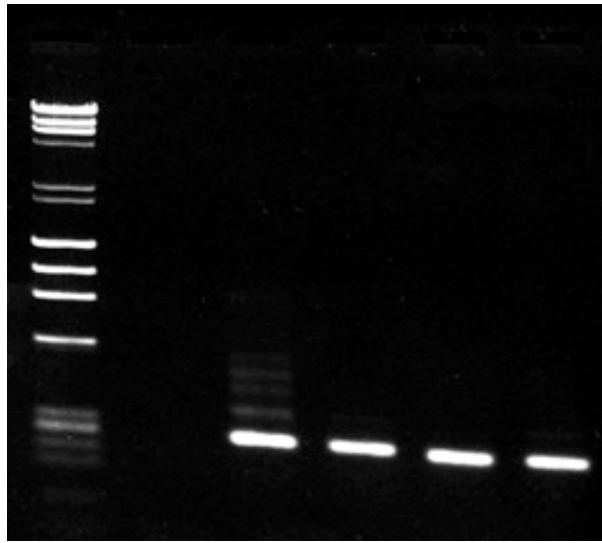
| | | | |
|------|--------|-------------|------------------------|
| 1 x | 12 min | 96 °C | initiale Denaturierung |
| 42 x | 20 sec | 96 °C | Denaturierung |
| | 20 sec | 49 °C/53 °C | Primerhybridisierung |
| | 45 sec | 72 °C | Elongation |
| 1 x | 10 min | 72 °C | Strangauffüllung |
| | ∞ | 4 °C | |

Nach Beendigung der Reaktion wurden die PCR-Ansätze durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.3.4.5.1 Nachweis der Selektivität

Die Selektivität der Konsensusprimer-PCR wurde mit Hilfe von folgenden Proben getestet: DNA aus PS-Zellen, die persistent mit PCV1 infiziert sind; DNA aus der Milz eines mit PCV2 infizierten Schweins; DNA aus der Bursa Fabricii eines BFDV-infizierten Papageis; DNA aus der Bursa einer Taube. Bei der Taube waren in der vorangegangenen EM-Untersuchung Cirocavirusartige Partikel festgestellt worden. Die Morphologie der Virionen legte eine Infektion mit einem bislang nicht bekannten Circovirus der Taube nahe. Die Sequenz des Taubencircovirus war bis zu dem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Die DNA wurde zunächst so isoliert wie unter 2.2.1 beschrieben; anschließend erfolgte die Durchführung der Kontroll-PCR.

Zur Durchführung der Konsensusprimer-PCR hatten alle Ansätze ein Volumen von je 25 µl. Die PCR-Bedingungen erfolgten wie unter 2.2.4.5 beschrieben. Die Ergebnisse zeigten, dass die in dieser Arbeit entwickelte Konsensusprimer-PCR alle zu untersuchenden Circoviren nachweisen konnte (Abb. 2.3).



M 1 2 3 4 5

Abb. 2.3: Das Ergebnis der Konsensusprimer-PCR. Als DNA-Matrize wurden DNA-Extraktionen aus Schwein, Papagei und Taube verwendet, bei denen eine circovirale Infektion beschrieben wurde. In allen 4 Fällen hatte das Amplifikat der zweiten Runde die erwartete Größe von etwa 240 bp. *M* Marker, *1* PCR ohne Template, *2* DNA aus der Bursa Fabricii eines BFDV-infizierten Papageies *3* DNA aus PCV1-infizierten PS-Zellen, *4* DNA aus der Leber eines PCV2-infizierten PMWS erkrankten Schweines, *5* aus der Bursa fabricii einer PiCV-infizierten Taube.

2.3.4.5.2 Nachweis der Sensitivität

Zum Nachweis der Sensitivität des PCR-Systemes wurden zunächst Verdünnungsreihen mit den Plasmiden pIC1 und pIC2 hergestellt. Diese Plasmide enthalten das Überlängengenom von PCV1 bzw. PCV2, d.h. das Genom inklusive einer Verdopplung von 100 bis 300 Nukleotiden. Die Plasmide wurden nach Konzentrationsbestimmung stufenweise in bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Verdünnungen wurden anschließend als Matrize in die Konsensusprimer-PCR eingesetzt und auf Gel aufgetragen, um die Sensitivität der PCR zu ermitteln. Die mathematische Analyse ergab eine Nachweisgrenze von 1,7 Kopien.

2.3.4.6 Etablierung einer diagnostischen PCR

Die diagnostische PCR wurde etabliert, um gezielt das in dieser Arbeit erstmalig detektierte Taubencircovirus PiCV unabhängig von der Konsensusprimer-PCR nachzuweisen. Für die PCR wurden Primer verwendet, die eine Region im *cap*-Gen amplifizieren. Da die Sequenz des *cap*-Gens zwischen den einzelnen Circoviren am stärksten variiert, konnte somit gewährleistet werden, dass von den bekannten Circoviren nur das Taubencircovirus mit dieser Methode detektiert wird.

Die Reaktionsansätze enthielten die gleichen Komponenten wie unter 2.3.4.5 beschrieben.

Eingesetzt wurden auch hier 150 ng/ μ l DNA. Die diagnostische PCR wurde als gestaffelte PCR durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur der Primer 330 und 331 (für Runde 1) und der Primer 332 und 333 (für Runde 2) betrug in der ersten und in der zweiten Runde 53 °C. Das in der ersten Runde erzeugte Amplifikat wies eine Größe von 575 bp auf, das in der zweiten Runde erzeugte Fragment besaß eine Größe von 336 bp. Die Reaktionsbedingungen sind unter 2.3.4.5 beschrieben.

2.3.5 Expressionsstudien in eukaryotischen Zellen

2.3.5.1 Herstellung religierter Virus-DNA

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsstudien wurde religierte Virus-DNA von PCV1 und PCV2 verwendet. Grundlage dafür waren die Plasmide pIC1 (Überlängengenom von PCV1) und pPCV2 (Überlängengenom von PCV2), die mit *Pst* I bzw. *Sac* I verdaut wurden. Die dabei entstandenen Fragmente mit einer Größe von 1759 bzw. 1768 bp wurden mittels Gel-Extraktion (2.3.3.3.1) aufgereinigt und anschließend über Nacht bei 16 °C religiert. Die Ligation wurde anschließend mit der Gel-Elektrophorese überprüft. Danach wurde die religierte Virus-DNA mit Ethanol gefällt und die Konzentration fluorometrisch bestimmt. Die religierte DNA wurde anschließend für die Transfektionsversuche eingesetzt.

2.3.5.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels nicht-liposomaler Lipide

Bei dieser Form der Transfektion wird die zu transfizierende DNA zunächst unter Beisein eines stark positiv geladenen Verstärkers kondensiert. Anschließend wird die kondensierte DNA von einem kationischem nicht-liposomalem Lipid umgeben (Effectene, QIAgen) und somit eine Mizellenbildung erreicht. Dieser DNA:Lipid-Komplex kann über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Für die Durchführung der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen einen Tag vorher auf Zellkulturgefäße verteilt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Es wurden nach Bedarf Zellen auf 60 mm Schalen, 6-Loch-, 12-Loch- und 24-Lochplatten transfiziert. Je nach Größe des Zellkulturgefäßes mussten Zellmengen eingesetzt werden, die einen 60 %-konfluenten Bewuchs am nächsten Tag gewährleisteten. Die zu transfizierende

DNA wurde in EC-Puffer verdünnt, mit dem Verstärker versetzt und für 1 sec gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation von 2-5 min. Nach Zuführung des Effectene Transfektionsreagenz wurden die Lösungen für 10 sec gemischt und zur Komplexbildung für 5-10 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde zu den Ansätzen Medium hinzu pipettiert und die DNA-Lipid-Komplexe sofort auf die Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Einen Tag später wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, um die restlichen Transfektionskomplexe zu entfernen.

Die jeweiligen Mengen an Transfektionsreagenzien richteten sich nach der Größe des Zellkulturgefäßes und sind für eine 24-Lochplatte der Tabelle zu entnehmen:

Tab. 2.7: Auflistung der zugehörigen Mengen an Puffern zur Durchführung einer Transfektion auf einer 24-Lochplatte mit dem Effectene Transfection Kit (Quiagen, Hilden)

| Doppelansatz | DNA (μg) | EC Puffer (μl) | Enhancer (μl) | Effectene (μl) | DMEM zu den Komplexen (μl) | DMEM zu den Zellen (μl) |
|----------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|--|
| 24-Loch-Platte | 200 ng/ μl | ad 60 | 1,6 | 5 | 350 | 350 |

2.3.5.3 Replikationsassay (kombinierter Luziferase/Galaktosidase-Assay)

Um die Replikationsfähigkeit von PCV in humanen Zelllinien zu überprüfen, wurde der kombinierte Luziferase/Galaktosidase-Assay durchgeführt.

Diese Methode beruht auf der Expression des Luziferase-Gens (*luc*) des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Luziferase katalysiert die Oxidation von Luziferin und Coenzym A unter Freisetzung eines Photons. Diese Lichtemission kann in einem Luminometer über einen Photomultiplier gemessen werden.

Zur Durchführung des Assays wurden die Zellen zunächst, wie unter 2.3.5.2 beschrieben, transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und nach zweimaligem Waschen das Zell-Lysis-Reagenz zu den Zellen gegeben. Es schloss sich eine Inkubation bei RT für 15 min an. Das Zelllysat wurde vom Gefäßboden abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5 sec in einer Tischzentrifuge) vom Überstand getrennt. Der eigentliche Luziferase-Nachweis erfolgte

in einem Luminometer mit automatischer Injektion des Luziferase-Assay-Reagenzes. In ein Messröhrchen wurden 5 µl Überstand eingeführt; die Messung erfolgte unmittelbar nach Injektion von 50 µl des Assay-Reagenzes für einen Zeitraum von 10 sec.

Die nähere Erläuterung des Replikationsassays erfolgt an anderer Stelle (siehe 3.2.5).

2.3.5.4 Nachweis von Apoptose

Für den Nachweis des programmierten Zelltod wurde der *M30 Cyto DEATH* Test und der *In Situ Cell Death Detection Kit* (beide von Roche Diagnostics) angewendet.

Der *M30 Cyto DEATH* Test beruht auf dem Einsatz Fluoreszenz-markierter Antikörper, die eine Variante des Zytokeratins 18 nachweisen, die nur in apoptotischen Zellen vorkommt und demzufolge als Apoptosemerkmal detektiert werden kann. Hierfür wurden die Zellen zuvor in einer 24-Lochplatte auf einem 15 mm Durchmesser Glasplättchen ausgesät und nachfolgend transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in eiskaltem Methanol bei -15 bis -20 °C für 30 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 2 mal mit PBS (0,1 % Tween 20) gewaschen und anschließend für 10 min bei 15-25 °C geblockt (PBS mit 1 % BSA, 0,1 % Tween 20). Danach wurden die Zellen mit 100 µl M30 Cyto DEATH Antikörper für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS (plus 0,1 % Tween 20) gewaschen und auf Objektträgern mit Immumount, Shandon, USA fixiert.

Der *In Situ Cell Death Detection Kit* weist die Strangbrüche in der DNA nach, die durch die Einleitung der Apoptose in den Zellen entstehen, indem an die freien OH-Gruppen mit Hilfe der Desoxynukleotidyltransferase mit Tetra-Ethyl-Rhodamin markiertes dUTP gebunden wird.

Die Zellen wurden auf 15 mm Durchmesser sterilen Glasplättchen ausgesät und in 24-Loch-Platten transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 15 min bei RT mit PBS (plus 4 % Paraformaldehyd) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 % Natriumcitrat für 2 min auf Eis permeabilisiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden unter feuchter Atmosphäre bei 37 °C mit 50 µl TUNEL Reaktions Mix für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen weitere 3 Male mit PBS und nachfolgend

mit Wasser zur Entfernung überschüssigen Salzes gewaschen, um dann auf einem Objektträger mit Mowiol fixiert zu werden.

Die Auswertung beider Methoden erfolgte am nächsten Tag mit der konfokalen Laser-scannmikroskopie, nachdem die Proben über Nacht bei 4 °C ausgehärtet waren.

2.3.5.5 Herstellung von Zyto-Spins

Für die Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztestes mussten Suspensionszellen, die auf ihrer Unterlage nicht haften, auf Objektträgern fixiert werden. Dies wurde mit Zytocentrifugation erreicht. Wird diese Methode eingesetzt, flachen die Zellen durch die Zentrifugation ab und eine etwaige Fluoreszenz kann im Innern der Zelle besser lokalisiert werden. Für die Durchführung wurden 2×10^5 Zellen benötigt, die sich in 150 bis 200 μl Kulturmedium befanden. Die dafür verwendeten mit 0,01 % Lysin beschichteten Objektträger wurden zur Adsorption des Mediums mit einem Filter abgedeckt, in dem zwei Löcher perforiert waren und dann in eine spezielle Apparatur eingespannt. Bis zu 200 μl der Zellsuspension wurden dann über einen kleinen Trichter in die perforierten Löcher des Filters hineinpipettiert. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm in einer Zytocentrifuge. Nach Zentrifugation wurde die Apparatur einschließlich des Filters entfernt und die Objektträger für etwa 35 min unter der Sicherheitswerkbank getrocknet. Danach erfolgte die Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztestes.

2.3.5.6 Der indirekte Immunfluoreszenztest

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) wurde verwendet um nach Transfektion bzw. Infektion von eukaryotischen Zellen mit PCV1 und PCV2 virale Proteine in den Zellen zu detektieren und zu lokalisieren. Für diese Methode wurden zwei Antikörper gebraucht, von denen der Primärantikörper spezifisch an das viral exprimierte Protein bindet, während der Sekundärantikörper wiederum spezifisch den Primärantikörper erkennt und an diesen bindet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, somit konnte das virale Protein auf indirektem Wege in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Zur Durchführung des iIFT wurden die Zellen auf 15 mm Durchmesser sterilen Glasplättchen ausgesät und in 24-Lochplatten transfiziert bzw. auf Objektträgern mit 8-Loch-Kammern

(Nalge Nunc International) aus Kunststoff infiziert. Infizierte Suspensionszellen wurden zuvor wie unter 2.3.5.5 beschrieben auf Objektträgern fixiert.

Nach vier Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um dann mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert zu werden. Nachdem die Zellen gewaschen wurden, erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X-100 für 10 min bei RT, um ein Eindringen des Antikörpers zu ermöglichen. Daraufhin mussten die Zellen dreimal mit PBS gewaschen werden. Nun erfolgte die Zugabe der Blocklösung (3 % FKS und 0,1 % Tween 20 in PBS) und die sich anschließende Inkubation in feuchter Atmosphäre bei 37 °C für 1 Stunde. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der gegen PCV gerichtete Primärantikörper in der Verdünnung 1:400 (für PCV1) und 1:200 (für PCV2) in Blocklösung auf die Zellen gegeben, so dass die Zellen damit benetzt waren. Dann erfolgte die Inkubation unter feuchten und dunklen Bedingungen bei 37 °C. Nach einstündiger Inkubation wurde der überschüssige Primärantikörper durch Waschen mit PBS entfernt, woran sich eine ebenso lange Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:200 mit Blocklösung verdünnt) anschloss. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit Wasser, um störendes Salz zu entfernen. Die Deckgläschen wurden danach auf einem Objektträger in einem Tropfen Immumount (Shandon, USA) gelegt und luftdicht fixiert. Den Kammer-Objektträgern hingegen wurde die 8-Loch Kammer abgenommen und die Zellen gleichfalls mit Immumount betropft und anschließend mit einem passenden Deckgläschen luftdicht verschlossen.

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C ausgehärtet und am nächsten Tag mit der konfokalen Laserscanmikroskopie analysiert

2.3.6 Mikroskopie

2.3.6.1 konfokale Laserscanmikroskopie

Die infizierten und transfizierten Zellen wurden nach Durchführung des iIFT und der Apoptosenachweise mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (cLSM) untersucht. Im cLSM war es möglich, virales Protein zu detektieren und zu lokalisieren. Der große Vorteil der konfokalen Laserscanmikroskopie ist die Möglichkeit, das von einer Probe emittierte Licht in einzelnen Ebenen zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal)

angeordnet ist, sorgt dafür, dass das Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst werden kann. Im cLSM wird ein Bild aus Einzeldaten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequenziell abgetastet wird. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein kontrastreiches, hochaufgelöstes Abbild der Probe.

Der Nachweis der fluoreszierenden Proteine resultiert aus der Tatsache, dass die zum Nachweis des viralen Proteins benutzten Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Durch die Bestrahlung des Fluorochroms mit Licht der Wellenlänge λ_{ex} werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Hier verweilen sie sehr kurz, verlieren dabei ein wenig Energie und fallen dann unter Aussendung von längerwelligem Emissionslicht auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Die Emission kann nachgewiesen und analysiert werden.

2.3.7 Virologische Methoden

2.3.7.1 Virusanzucht auf der porzinen Nierenzelllinie PS

Für die Infektionsstudien, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, mussten Virusstocks sowohl von PCV1 als auch von PCV2 hergestellt werden.

Dafür wurden PS-Zellen zunächst mit religierter Virus-DNA sowohl von PCV1 als auch von PCV2 in 60 mm Schalen transfiziert (wie unter 2.3.5.2 beschrieben). Nachdem die transfizierten Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie auf größere Flaschen umgesetzt und so lange kultiviert bis auch diese konfluent zugewachsen waren. Um nun das Virus sowohl aus dem Überstand als auch aus den Zellen zu isolieren, wurden die bewachsenen Flaschen bei -20 °C gelagert. Sobald das Medium eingefroren war, wurden die Flaschen aus dem Gefrierfach entnommen und bei RT angetaut. Mit dem angetauten, noch vereisten Medium wurde durch Schütteln der Flaschen ein Aufschließen der Zellen erreicht. Nach völligem Auftauen des Mediums wurden die Flaschen zurück in das Gefrierfach gestellt und erneut eingefroren. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach Beendigung des Vorganges wurde das aufgetaute Medium in 50 ml Greiner Standzylinder überführt und zweimal für 30 min bei 1000 rpm bzw. 4000 rpm in der Heraeus Varifuge 3.0R zentrifugiert um den Zelldetritus zu entfernen. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation für 1,5 h bei 25000 rpm in einem SW28 Rotor in einer Beckmann L8M-Ultrazentrifuge. Die Überstände wurden

vorsichtig verworfen und das Viruspellet in 250 µl Medium aufgenommen.

2.3.7.2 Virustiterbestimmung

Nach der Isolierung der Virussuspension wurde der Titer bzw. die TCID₅₀ des Virusstocks bestimmt. Die TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) gibt die Konzentration eines Virus in einer spezifischen Suspension an, die 50 % einer Anzahl von (n) Zellkulturplatten infiziert. Für die Bestimmung der TCID₅₀ wurde eine Verdünnungsreihe der Virusstocks in 10er Potenzen hergestellt. Mit je einer Verdünnungsstufe wurden auf einer 24-Lochplatte zwei Vertiefungen mit PS-Zellen infiziert. PS-Zellen wurden auf einer 24-Lochplatte ausgesät, in deren Vertiefungen zuvor sterile Glasplättchen eingebracht wurden. Nachdem die Zellen etwa zu 60 % konfluent waren, wurden sie mit der Virusverdünnung infiziert, wobei die ersten beiden Vertiefungen nicht infiziert wurden und somit als Negativkontrolle dienten.

Nach fünf Tagen wurde der IFT durchgeführt (wie unter 3.2.5.5 beschrieben), anschließend wurden die Zellen unter dem cLSM analysiert. Die Vertiefungen der 24-Lochplatte, die Fluoreszenz zeigten, wurden ausgezählt und die TCID₅₀ wie folgt berechnet:

$$\text{Titer/ml} = D (n/p + 0,5) / D_0 \times D \times V$$

D = Verdünnungsfaktor

n = Anzahl positiver Vertiefungen auf der ganzen Platte

p = Anzahl Parallellbestimmungen

D₀ = erster Verdünnungsschritt

V = Volumen in ml

2.3.7.3 Die Durchführung von Infektionsstudien an eukaryotischen Zellen

2.3.7.3.1 Die Infektion adhärenter Zellen

Die einzusetzende Viruskonzentration wurde zunächst an der porzinen Zelllinie PS ermittelt und dann auf die humanen Zellen übertragen. Hierfür wurden einen Tag vor der Infektion PS-Zellen auf einer 24-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wuchsen dabei auf sterilen Deckgläschen.

Für eine Infektion mit PCV1 wurden 30 µl des infektiösen Überstands mit einer TCID₅₀/ml von 10⁷ pro Vertiefung in das Medium pipettiert, für eine Infektion mit PCV2 wurden 15 µl eingesetzt (TCID₅₀/ml von 10⁸). Für PCV1 und PCV2 ergab sich dabei auf einer 24-Lochplatte eine MOI („multiplicity of infection“) von 3 x 10⁻² pro Zelle. Eine schrittweise Erhöhung der eingesetzten Menge an Virus ergab keine wesentlichen Steigerungen der Infektionseffizienz.

Für die Infektion humaner Zellen wurden zwei Ansätze vorbereitet. Die Zellen wurden hierfür einen Tag vor der Infektion auf 8-Kammer-Objektträger aus Kunststoff verteilt und über Nacht inkubiert. Infiziert wurden alle unter 3.2 genannten adhärennten Zelllinien. Am folgenden Tag erfolgte die Infektion mit 1 x 10² infektiösen Einheiten (i.E.), 2 x 10³ i.E. und 7 x 10³ i.E. von PCV1 und von PCV2; als Positivkontrolle diente die porcine Nierenzelle PS. Fünf Tage nach Infektion wurde der erste Infektionsansatz mittels indirekter Immunfluoreszenz auf eine circovirale Infektion hin untersucht. Der zweite Ansatz wurde auf eine 24-Lochplatte umgesetzt und weiter inkubiert. Diese Zellen wurden noch zwei weitere Male umgesetzt und anschließend der Überstand abgenommen und steril filtriert. Als Positivkontrolle dienten PS-Zellen. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz auf eine PCV-Infektion hin untersucht oder verdünnt und weiter inkubiert.

2.3.7.3.2 Die Infektion von Suspensionszellen

Hierfür wurden die Suspensionzellen am Tag der Infektion auf 6-Lochplatten verteilt. Ausgesät wurden 2 x 10⁶ Zellen. Für eine Infektion mit PCV1 wurden dem Medium 150 µl Virusstock mit einer TCID₅₀ von 10⁷ zugeführt, für eine Infektion mit PCV2 50 µl infektiöser Überstand mit einer TCID₅₀ von 10⁸. Als Positivkontrolle diente die Schweinezelle L23. Anschließend erfolgte eine Inkubation über fünf Tage. Danach wurden die zu untersuchenden Zellen auf Objektträgern fixiert (2.3.5.5) und mittels IFT (2.3.5.6) auf das Auftreten einer Virusinfektion untersucht.

Die genauere Erläuterung erfolgt unter 3.2.3.4.